

[First Hit](#)[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

Generate Collection

Print

L31: Entry 2 of 9

File: JPAB

May 25, 1999

PUB-NO: JP411140102A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 11140102 A

TITLE: APPLE VINEGAR-DERIVED ANTITUMORAL POLYSACCHARIDE AND PREPARATION THEREOF

PUBN-DATE: May 25, 1999

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

ABE KAORU

MATSUE, HAJIME

KUSHIBIKI, TOSHISADA

ARAI, RIKAKO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

AOMORI PREFECTURE

KANESHO KK

APPL-NO: JP09303079

APPL-DATE: November 5, 1997

INT-CL (IPC): C08 B 37/00; A61 K 31/715; A61 K 35/78

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To extract and purify an antitumoral polysaccharide having such a new structure that has not been known until now, from an apple vinegar as a raw material.

SOLUTION: This apple vinegar-derived antitumoral polysaccharide is a polysaccharide comprising the main component of a glucose which has in the mol. α -1,4-linkage and α -1,6-linkage and has a range of a mol.wt., in dextran equivalent, of 7,000 or more to 17,000 or less; it is extracted from an apple vinegar and purified, and also it can recover a malignant tumor by giving to a cancer patient.

COPYRIGHT: (C)1999, JPO

[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-140102

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月25日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 8 B 37/00

C 0 8 B 37/00

G

// A 6 1 K 31/715

A D U

A 6 1 K 31/715

A D U

35/78

35/78

H

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号

特願平9-303079

(71) 出願人 591005453

青森県

青森県青森市長島1丁目1番1号

(22) 出願日

平成9年(1997)11月5日

(71) 出願人 593129076

カネショウ株式会社

青森県弘前市大字蔵主町15-23

(72) 発明者 阿部 馨

青森市大字八ツ役字芦谷202の4 青森県
産業技術開発センター内

(72) 発明者 松江 一

青森市大字八ツ役字芦谷202の4 青森県
産業技術開発センター内

(74) 代理人 弁理士 佐々木 實

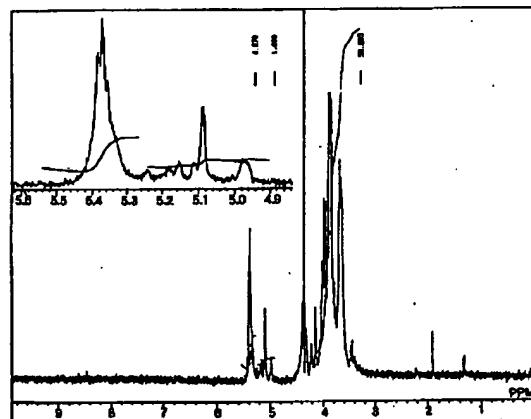
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖、およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 これまで知見されたことのない新たな構造の抗腫瘍性多糖を、リンゴ酢を原料として抽出、精製しようとするものである。

【解決手段】 分子内にアルファー-1, 4-結合およびアルファー-1, 6-結合を有し、分子量範囲が、デキストラン換算で7000以上17000以下の範囲にあるところのグルコースを主成分とする多糖であり、リンゴ酢から抽出、精製され、ガン患者に投与して悪性腫瘍を治療できる。



りんご酢由来抗腫瘍多糖のプロトンNMRスペクトル (270MHz, 重水中, 70℃)。内部図は4.9-5.6ppmの拡大図。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルファー-1, 4-結合の主鎖にアルファー-1, 6-結合の分岐構造を有するグルコースを主成分とし、分子量範囲が、デキストラン換算で7000以上17000以下、平均分子量略10000のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖。

【請求項2】 以下の物性を有することを特徴とするリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖。

(a) 分子量範囲がデキストラン換算で7000以上17000以下であり、セファクリル S-300によるゲル濾過分析によって平均分子量10000に主ピークを有すること。

(b) グルコースを主成分とする多糖であること。

(c) 分子内にアルファー-1, 4-結合およびアルファー-1, 6-結合を有すること。

【請求項3】 以下の物性を有することを特徴とするリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖。

(a) 白色ないし淡褐色粉末で、水に溶けやすいこと。

(b) 分子量範囲がデキストラン換算で7000以上17000以下であり、セファクリル S-300によるゲル濾過分析によって平均分子量10000に主ピークを有すること。

(c) グルコースを主成分とする多糖であること。

(d) プロトン-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) スペクトルを示し、NMRによって糖のみからなるシグナルを示すこと。

(e) 透析膜を通過しないこと。

(f) フェノール硫酸反応およびヨード反応で、夫々陽性を示すこと。

(g) 水溶液中における紫外吸収極大を示さないこと。

(h) 分子内にアルファー-1, 4-結合およびアルファー-1, 6-結合を有すること。

【請求項4】 リンゴ酢を減圧濃縮後あるいはそのまま蒸留水に対して透析(透析膜36/32、分子量12000~14000)を行い、透析内液を凍結乾燥する工程、上記凍結乾燥物をセファクリル S-300ゲルによるゲル濾過クロマトグラフィーを行い、デキストラン換算で1000以上40000以下の画分を得て脱塩する工程、および、その後、弱陰イオン交換クロマトグラフィー、例えばDEAE セファロース ファースト フロー陰イオン交換ゲルを充填したカラムクロマトグラフィーに付し、カラム担体容量の少なくとも2倍量の希薄な中性緩衝液で溶出、脱塩した後、凍結乾燥する工程、からなるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の目的】この発明は、抗腫瘍性多糖に関するものであって、特に青森県特産のリンゴから醸造されたリンゴ酢を原料にして抽出、精製して得られるところの抗腫

瘍活性を示す新規な構造からなるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖を提供しようとするものである。

【0002】

【従来の技術】北米バーモント地方の人々が好んで飲んでいるバーモント酢、即ち、ティースプーン1杯のリンゴ酢に同じく1杯の蜂蜜を加え、コップ一杯の水で薄めた飲み物は、バーモント地方の人々が長寿を保てる理由の一つと考えられていて、非常に健康に良いものといわれてきているが、その効果を示す生理活性物質の構造的知見について、これまでのところ開示されたという情報は全くなく、先の事実からして、全国一のリンゴ生産を誇る特異な地域柄から、その解明は極めて興味深いテーマの一つとなっていた。

【0003】現代社会において長寿を全うできる条件としては様々な要因を考慮しなければならないが、その中でも、悪性腫瘍(癌)への罹病率の多寡は、長寿の条件を判断する上で重要な因子となり得ることが既に周知されている。

【0004】一方、これまでに、数多くの宿主仲介性の抗腫瘍性多糖が、穀類や果実等といった種々の材料から見い出されているのも事実であり、例えば、キノコ等から抽出された β -(1,3)-(1,6)-グルカン是非常に有名であり、更に、各糖残基間のグルコシド結合がアルファ結合をとっている抗腫瘍性多糖のその他の例としては、例えば、昭和61年特許公開第18722号公報に掲載された発明に見られるように、米糠を原料としたアルファー(1,6)-グルカンがあり、また、人参三七の根から得られるアルファー(1,4)-グルカンは、平成1年特許公開第88688号公報の発明として掲載されており、また、平成6年特許公開第27929号公報には、貝類を原料としたグリコーゲン、アルファー(1,4)-(1,6)-グルカンが、分子量10万以上の抗腫瘍性多糖として掲載されている。

【0005】これらのことを類推、勘案した結果、北米バーモント地方の人々の長寿の要因の一つと考えられているリンゴ酢が、何かある種の抗腫瘍性多糖を含んでいるのではないかと予測をたて、この発明では、リンゴ酢から抗腫瘍性を有する新規な多糖成分を見い出すべく、逸早く、慎重な分析、検討を加えてきたところ、遂に、以下において詳述するところの新規な構造からなるりんご酢由来抗腫瘍性多糖と、それを抽出、精製するための新規な製造方法とを完成、実用化することに成功したものである。

【0006】

【発明の構成】この発明のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖は、基本的に以下のとおりの構成を要件とするものである。即ち アルファー-1, 4-結合の主鎖にアルファー-1, 6-結合の分岐構造を有するグルコースを主成分とし、分子量範囲が、デキストラン換算で7000以上17000以下、平均分子量略10000のリンゴ酢由来

抗腫瘍性多糖である。

【0007】上記のとりの構造を基本とするこの発明のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖は、物性からその構成を示せば、(a) 分子量範囲がデキストラン換算で7000以上17000以下であり、セファクリル S-300 によるゲル透過分析によって平均分子量10000に主ピークを有すること。(b) グルコースを主成分とする多糖であること。(c) 分子内にアルファ-1, 4-結合およびアルファ-1, 6-結合を有すること。以上の

とりの、少なくとも3要素を備えてなることを特徴とするリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖とすることができる。【0008】更に具体的には、次のとりの物性を特徴とするリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖であるとしてその構成を示すことも可能である。即ち、(a) 白色ないし淡褐色粉末で、水に溶けやすいこと。(b) 分子量範囲が、デキストラン換算で7000以上17000以下であり、セファクリル S-300 によるゲル透過分析によって平均分子量10000に主ピークを有していること。

(c) グルコースを主成分とする多糖であること。(d) プロトン-NMR (Nuclear Magnetic Resonance) スペクトルを示し、NMRによって糖のみからなるシグナルを示すこと。(e) 透析膜を通過しないこと。(f) フェノール硫酸反応で陽性、ヨード反応で陽性を示すこと。(g) 水溶液中における紫外吸収極大を示さないこと。(h) 分子内にアルファ-1, 4-結合およびアルファ-1, 6-結合を有していること。の8要素を備えてなるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖である。

【0009】

【関連する発明】この発明には、上記したリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖に関連し、以下のとりの構成からなるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の製造方法を包含している。先ず、リンゴ酢を減圧濃縮後あるいはそのまま蒸留水に対して透析(例えば、三光純薬株式会社、透析膜36/32、分子量12000~14000等)を行い、透析内液を凍結乾燥する工程。次いで、上記凍結乾燥物をセファクリル S-300ゲルによるゲル透過クロマトグラフィーを行い、デキストラン換算で1000以上4000以下の画分を得た上、脱塩する工程。その後において、弱陰イオン交換クロマトグラフィー、例えばDEAE セファロース ファースト フロー陰イオン交換ゲル(商品名、ファルマシア社製等)を充填したカラムクロマトグラフィーに付し、カラム担体容量の少なくとも2倍量の希薄な中性緩衝液で溶出脱塩後、凍結乾燥する工程。以上の工程からなるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の製造方法である。

【0010】上記透析、ゲル透過クロマトグラフィー、弱陰イオン交換クロマトグラフィー等においては、他のゲル透過担体、イオン交換樹脂、限外透過膜等を用いて行うことができる。

【0011】この発明の方法によって抽出分離精製された抗腫瘍性多糖の性質は、化学分析結果から、次のとおりである。

「平均分子量」図2のセファクリル S-200ゲル(商品名、ファルマシア社製)透過クロマトグラフィーによる流出パターンから、標準資料の流出液量に対するそれら分子量の片対数プロットに抗腫瘍性多糖の流出液量を外挿することにより、分子量を推定したところ、リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の平均分子量10000であることが判明した。

【0012】「プロトンNMR」この化学分析は、乾燥資料2ミリグラムを99.8%D2Oに溶解し、12時間室温で振盪し、重水置換を行い、凍結乾燥した。同様の操作を99.8%D2Oおよび99.95%D2Oにて行い、次に99.93%D2Oに溶解し、70°CでNMRを測定した。NMRの測定には、270-MHz ¹H-NMR (JNM EX-270、日本電気製)を使用した。その結果が、図1のとおりであって、5.373ppmにα-1, 4結合に由来するシグナル、4.963ppmにα-1, 4, 6結合に由来するシグナルを示し、3.4-4.4ppmに多糖由来と思われるシグナルが捕えられ、糖のみからなるシグナルを示す。

【0013】「化学成分分析値」糖の組織組成が、次の分析法によってグルコースのみからなることが判明する。即ち、2規定塩酸で2時間加水分解したものをサンプルとし、ビリジリアミノ化装置(宝酒造株式会社 PALSTATION model 4000)でビリジリアミノ化したものを PALPAK Type A カラム(4.6×150mm)を用い、溶媒は、0.7M カリウム-ホウ酸 緩衝液(pH9.0)/アセトニトリル(90/10, v/v)、流速は、0.3ミリリットル/分、カラム温度は65°C、検出は蛍光検出器を用い励起波長310nm測定波長380nmで、HPLC (High performance Liquid Chromatography) による糖組成分析した結果、図3のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖のビリジリアミノ化法による糖組成分析による分離パターンが示しているように、リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖は、キシロース、グルコース、マンノースおよびガラクトースからなる多糖であり、その殆どがグルコース(9.7%)からなる多糖であることが明らかにされた。以下では、この発明における抗腫瘍性多糖の製造法、および、有効画分の投与法の例を、更に詳しく説明することにする。

【0014】

【実施例1】この実施例は、リンゴ酢からの抗腫瘍性多糖の抽出方法の一事例を示すものであり、リンゴ酢500ミリリットルを100ミリリットルに減圧濃縮後、蒸留水70ミリリットルを加えて全量170ミリリットルにした後、再び減圧濃縮し、凡そ全量100ミリリットルにしたものを、蒸留水に対して透析した。透析内液

(粗抗腫瘍性多糖)は、凍結乾燥後、冷蔵保存した。なお、透析内液の乾燥重量は、りんご酢乾燥重量の約7%であった。

【0015】

【実施例2】次に、分離、精製例を示すと、粗抗腫瘍性多糖20ミリグラムを0.1モル塩化ナトリウム水溶液に溶解し、セファクリル S-300ゲル(商品名、ファルマシア社製)、カラム(2.3×118cm)により、溶出液として0.1モルNaClを用い、流速は、0.5ミリリットル/分で精製した。各フラクション(5ミリリットル)をフェノール硫酸法で中性糖を測定し、流出パターンを図4に示してある。F1、F2およびF3の三つの画分に分け、脱塩後、凍結乾燥した。収量は、F1が1.6ミリグラム(12.8%)、F2が3.8ミリグラム(30.4%)、およびF3が7.0ミリグラム(56.8%)であった。

【0016】更に、このF3を、DEAE セファロース ファースト フロー陰イオン交換ゲル(商品名、ファルマシア社製)を用いた弱陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画精製した。溶出緩衝液には20ミリモル/リットル トリス塩酸緩衝液(pH7.2)を用い、分離した(図3を参照)。フェノール硫酸法で中性糖を測定し、3つの画分(a・b・c)に分け、透析*

*後、凍結乾燥した。収量は、aが3.6ミリグラム(56%)、bが1.7ミリグラム(25%)、およびc1.2ミリグラム(19%)であった。図中、aがりんご酢由来抗腫瘍性多糖である。

【0017】

【実施例3】抗腫瘍実験例は、次のとおりである。6週令メス、平均体重20グラムのBALB/C-CRJマウスに1週間、同系のマウスの腹腔内で継代した癌細胞Meth-Aを、マウス1匹当たり1×10⁵個を腹腔内に移植し、対照群5匹(1群)と試験群(1群)の計2群に分けた。

【0018】癌細胞を移植した2日目、4日目、6日目に、試験群には、0.625ミリグラムの抗腫瘍性多糖を0.2ミリリットルの生理食塩水に溶解し、腹腔内に投与した。対照群には、同様にして生理食塩水のみを投与した。以後、生存日数を60日まで観察し、延命効果を次式によって算出した。

延命率(%)=(試験群の平均生存日数群)/(対照群の平均生存日数)×100

上記方法によって検定したリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の抗腫瘍効果は、下表のとおりであった。

【0019】

【表1】

サンプル名	平均生存日数(日)	延命率(%)
対照(生理食塩水)	13.8	-
粗抗腫瘍性多糖(0.625 mg/匹)	21.6	157

【0020】

【実施例4】続いて、第2の抗腫瘍実験例を示すと、次のとおりである。6週令メス、平均体重20グラムのBALB/C-CRJマウスに1週間、同系のマウスの腹腔内で継代した癌細胞Meth-Aを、マウス1匹当たり1×10⁵個を腹腔内に移植し、対照群5匹(1群)と試験群(1群)の計2群に分けた。

【0021】癌細胞を移植した2日目、4日目、6日目に、試験群には、0.2ミリグラムの抗腫瘍性多糖を ※

※0.2ミリリットルの生理食塩水に溶解し、腹腔内に投与した。対照群には、同様にして生理食塩水のみを投与した。以後、生存日数を60日まで観察し、延命効果を次式によって算出した。延命率(%)=(試験群の平均生存日数群)/(対照群の平均生存日数)×100上記方法によって検定したリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の抗腫瘍効果を示すと、下表のとおりである。

【0022】

【表2】

サンプル名	平均生存日数(日)	延命率(%)
対照(生理食塩水)	16.2	-
粗抗腫瘍性多糖(0.2 mg/匹)	28.2	157

【0023】

【作用効果】リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖を用いた腫瘍に対する治療法としては、リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖を生理食塩水、あるいは各種塩溶液に溶解の後、病巣部に直★50

★接注射による投与、静脈投与等が可能である。また、本来生体内に存在する物質と似ているため、毒性は無く、したがって、その病状により、その投与量を広い範囲でコントロールし得る。

【0024】この発明において、その抗腫瘍活性を以下の方法によって確認することができる。即ち、マウスの腹腔内に腫瘍細胞を移植し、このマウスにリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖を生理食塩水に溶解させ、投与することによって腫瘍を治療することができた。この実験において、治療されたマウスに副作用は観察されなかったことから、急性毒性はないものと考えられ、腫瘍に対し大変有望な物質であることを確認することができた。

【0025】このような特徴を有する抗腫瘍性多糖としては、キノコ等から抽出された β -(1,3)(1,6)-グルカンが有名であるが、この発明におけるリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖は、各糖鎖残基間のグリコシド結合が逆のアルファ結合をとっており、物質的に全く異なるものである。また、抗腫瘍性活性を示す多糖には、この他にも幾つか存在することが報告されており、これら多糖のアルファ-グルカンで抗腫瘍性のあるものも知られているが、それらはアルファ-1,4-結合のみからなるもの(人参三七の根から得られる多糖等)、あるいはアルファ-1,6-結合のみからなるもの(米糠を原料とした多糖等)であって、この発明のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖とは、その構造および分子量が大きく異なる。

【0026】また、アルファ-1,4-結合とアルファ-1,6-結合を持つグリコーゲン(貝類を原料としたグリコーゲン等)も知られているが、この発明のリンゴ酢由来抗腫瘍性多糖の分子量が2万以下であるのに対し、それら公知のものは、分子量10万以上であって全く別の物質である。

【0027】叙述の如く、この発明は、通常食されてい

るリンゴ酢から抗腫瘍多糖を抽出し、且つその得られた抗腫瘍多糖の抗腫瘍活性に関する開発、研究を継続し、幾多の試行錯誤を重ねてきた結果、遂にこの発明のリンゴ酢由来抗腫瘍多糖には、強い抗腫瘍性があることを確認することに成功し得たものであり、この固有の特徴は、この発明のリンゴ酢由来抗腫瘍多糖に細胞毒性が見られないことにより、免疫機構、つまり、生体の本来持つべき自己防御機構を活性化して腫瘍細胞に対する抵抗性を高め、その結果、腫瘍細胞の増殖を抑制するのではないかと考えられるものであり、この有効な特徴により、この地域の特産となっているリンゴが、大いにその付加価値を高めた活用を可能として地域産業の発展に寄与できると共に、何よりも人類医学の面で高い評価が得られるものと予想される。

【図面の簡単な説明】

【図1】リンゴ酢由来抗腫瘍多糖のプロトン-NMRスペクトルである。

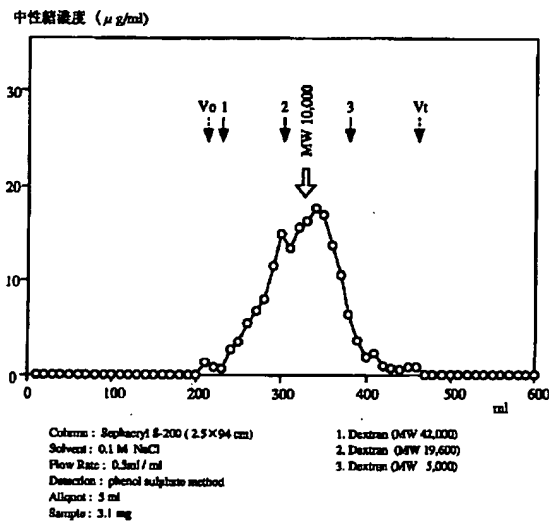
【図2】粗抗腫瘍多糖のセファクリル S-300 ゲルによるゲル透過クロマトグラフィー分離パターンである。

【図3】リンゴ酢由来抗腫瘍性多糖のビリジリアミノ化法による糖組成分析による分離パターンである。

【図4】リンゴ酢由来抗腫瘍多糖のセファクリル S-200 ゲルによるゲル透過クロマトグラフィー分離パターンである。

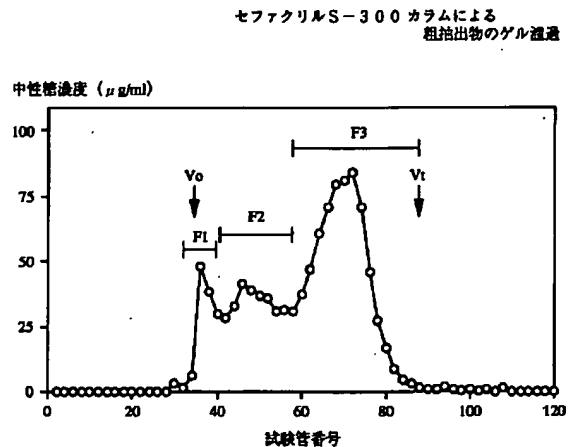
【図5】ゲル透過クロマトグラフィーF3画分のDEAE セファロース ファースト フロー 弱陰イオン交換樹脂によるイオン交換クロマトグラフィー分離パターンである。

【図2】

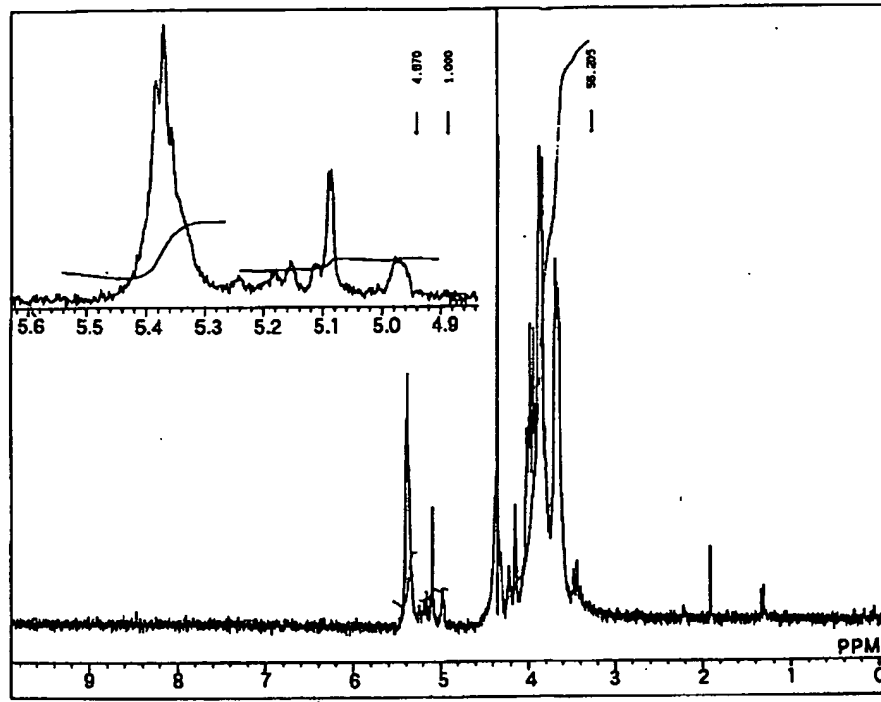


セファクリル S-200 カラムによるりんご酢由来抗腫瘍多糖の分子量の推定

【図4】



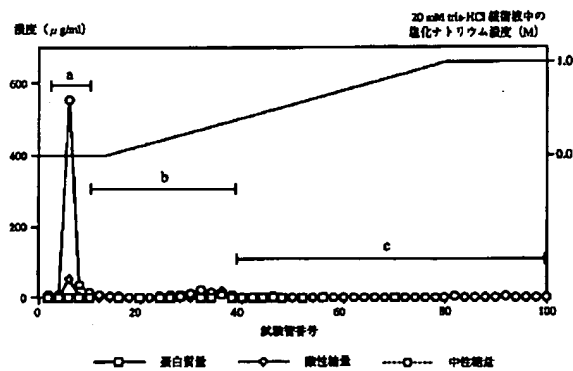
【図1】



りんご酢由来抗腫瘍多糖のプロトンNMRスペクトル (270MHz, 重水中, 70℃)。内部図は4.9-5.6ppmの拡大図。

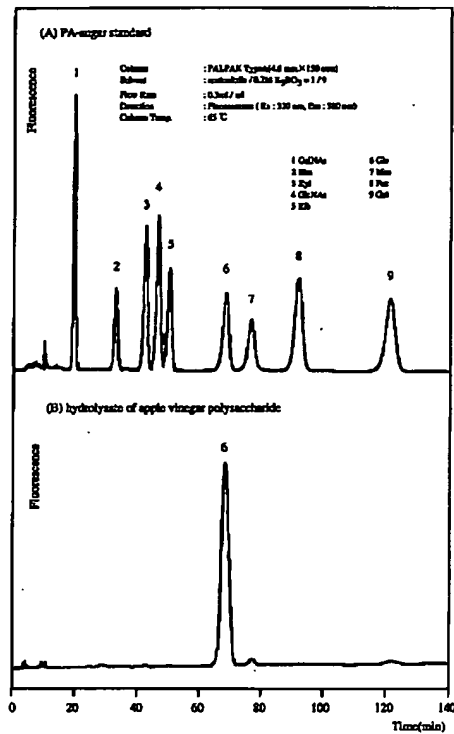
【図5】

DEAE セファロース 陰イオン交換カラムによる
セファクリル S-300 F3面分の分離精製



【図3】

りんご酢抗腫瘍多糖A-F3-aのPA化法による糖組成分析



フロントページの続き

(72)発明者 櫛引 利貞
 青森県弘前市蔵主町15番地23号 カネシヨ
 ウ株式会社内

(72)発明者 荒井 吏香子
 青森県南津軽郡尾上町大字日沼字富田30の
 9 弘前機能性食品開発協同組合内